

虚血ラット網膜におけるアスパラギン酸アミノ基転移酵素活性低下のメカニズムについて

著者	遠藤 聡子
号	1659
発行年	2000
URL	http://hdl.handle.net/10097/21998

氏 名（本籍）
遠 藤 聡 子

学 位 の 種 類
博 士（医 学）

学 位 記 番 号
医 博 第 1 6 5 9 号

学位授与年月日
平 成 12 年 3 月 23 日

学位授与の条件
学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻
東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）外科学系専攻

学 位 論 文 題 目
虚血ラット網膜におけるアスパラギン酸アミノ基
転移酵素活性低下のメカニズムについて

（主 査）

論文審査委員
教授 玉 井 信 教授 林 典 夫

教授 柴 原 茂 樹

論文内容要旨

目 的

グルタミン酸は網膜において細胞の代謝に関与する他に、グルタミン酸受容体を刺激することにより細胞膜透過性を増す興奮性アミノ酸としての働きがあることが知られている。グルタミン酸代謝の関連酵素としてグルタミナーゼ、グルタミン酸合成酵素、グルタミン酸脱水素酵素、オルニチンアミノ基転移酵素、アスパラギン酸アミノ基転移酵素（AAT）などがある。虚血網膜では細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によりミトコンドリア内への Ca^{2+} の流入が起こり、その結果、様々なミトコンドリアに存在する酵素がカルシウム依存性蛋白質分解酵素の活性化により色々な影響を受けていると考えられている。一般に、網膜で虚血に対する脆弱性を示すのは網膜内層であるが、グルタミン酸の過剰な放出はミュラー細胞、視細胞、網膜色素上皮細胞機能にも影響を及ぼすともいわれている。AAT はグルタミン酸代謝関連酵素群のうちで最も活性レベルが高く、視細胞内節や外網状層に多く存在していることがこれまでに報告されている。今回、虚血網膜における AAT 活性の変化を測定し、さらにミトコンドリア AAT (mAAT) に対する Ca^{2+} の影響を調べ、また虚血網膜におけるカルシウム依存性蛋白質分解酵素（カルパイン）活性も測定し、AAT 活性変化のメカニズムを解析した。

方 法

虚血モデルとして、RCS ラット (rdy+/rdy+) の視神経を明順応下結紮、低酸素状態モデルとして摘出した RCS ラット (rdy+/rdy+) の eye-cup (強膜に網膜をつけた状態) を 95% N_2 / 5% CO_2 で飽和された glucose-free の Locke 溶液で灌流した。AAT 酵素液は 0.25 M sucrose 溶液を得られた網膜に加え、ホモジェナイズ後、遠心分離を行い各細胞分画に分け調製した。透析後、AAT 活性は Godfrey らの方法に従って測定した。全網膜の AAT 活性は 780 ± 8.0 nmol / min / mg protein であり、ミトコンドリア分画に約 75%、細胞質分画に約 20% 分布していた。90 分間の虚血、低酸素状態に置くことより mAAT 活性は約 80% まで低下した。一方、細胞質 AAT (cAAT) 活性は有意な変化は認められなかった。この mAAT 活性の低下に対するカルシウムイオンや各種蛋白質分解酵素阻害剤の影響を調べるために、我々は低酸素状態の Locke 溶液または Ca^{2+} -free の Locke 溶液に EGTA, リアノジン, タプシガルジン (Ca^{2+} -ATPase inhibitor), カルパイン阻害剤（カルペプチン, カルパインインヒビターペプチド）などを加え、eye-cup を 90 分間灌流し、mAAT の変化を調べた。加えて、我々は細胞分画法によりカルパイン活性の細胞内分布を調べ、また虚血ラット網膜でのカルパイン活性も測定した。カルパイン活性の測定は

Cell Probe LY Calpain Enzyme Substrate (COULTER, USA) を基質として用い、反応後、分解生成された蛍光物質を測定することによりサンプル中のカルパイン活性を測定した。

結 果

Ca²⁺-free にした Locke 溶液に EGTA, タプシガルジンを加えることにより、低酸素ラット網膜における mAAT 活性の低下は約 90% 押さえられることがわかった。また、mAAT 活性はカルパイン阻害剤（カルペプチン、カルパインインヒビターペプチド）によっても低下が約 85% 押さえられることがわかった。又、カルパイン活性は全網膜では 145 ± 7.5 U/mg protein であり、細胞質分画に 60%、ミトコンドリア分画には 20% 分布していた。90 分間の虚血により細胞質分画カルパイン活性は正常と比較して約 60% に低下したが、一方、ミトコンドリア分画カルパイン活性は正常値の 2.5 倍に上昇することがわかった。

考 察

今回、AAT 活性の虚血時の変化を測定し、虚血時に低下するメカニズムについて研究した。AAT は網膜において興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の代謝に関与する酵素群の 1 つであるが、網膜エネルギー代謝にも深く関連している。これまで虚血状態では細胞内 Ca²⁺ 濃度は上昇し、この Ca²⁺ のホメオスタシスの崩壊が虚血傷害を引き起こすのであろうといわれているが、今回の研究の結果、ラット網膜では虚血により mAAT 活性の約 20% の低下が認められたが、これはミトコンドリアにおける Ca²⁺ 濃度の上昇によりカルパインの活性化が起こり、mAAT の degradation が引き起こされるためであらうと生化学的見地から推察することができた。また、AAT の網膜内分布は視細胞内節や外網状層に多く分布しているといわれており、虚血時の 20% の低下は網膜のある特定の細胞が障害されるためにおこるのだろうと考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

高齢化社会を迎え失明原因の重要な機序は、血管障害や緑内障で眼圧上昇によって網膜が虚血状態に陥ることによる機能低下である。そのメカニズムは、神経伝達物質であるグルタミン酸が虚血時にはグルタミン酸受容体を過剰刺激することによって細胞膜の透過性が亢進し、細胞内カルシウム濃度が上昇し、ミトコンドリア内のカルシウム上昇が起こる。その結果カルシウム依存性蛋白分解酵素の活性化によって細胞障害が起きることが示されている。このように虚血時はグルタミン酸が過剰に放出されるため、網膜のミュラー細胞、視細胞、色素上皮細胞など網膜細胞の機能維持に重要な影響を及ぼすことが考えられる。本研究は、グルタミン酸代謝に関与するアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AAT）に着目し、虚血によってAATの活性がどのように起きるのかを研究したものである。研究はラットの網膜中心動静脈の血流を途絶する方法で網膜虚血を作製した。AAT活性をこの虚血網膜で測定したところ、ミトコンドリア分画と細胞質分画のうち、前者で正常網膜に比べ80%に低下することが明らかになった。さらに活性低下に対するカルシウムチャンネル阻害剤やタンパク質分解酵素阻害剤の影響を見たところ、タブシガルジン、EGTAを加えることにより、虚血によるミトコンドリア分画のAATの活性の低下をほとんど押さえることが明らかになった。また、カルパイン阻害剤によっても同様に押さえられることがわかり、このAAT活性の虚血による低下は、細胞外からのカルシウム流入による細胞内カルシウムの上昇によって引き起こされるカルパインの活性化によってAATの変性が引き起こされるためであろうと推察した。これらの研究結果は網膜の虚血状態における機能低下や細胞死に到るメカニズムを推測する上で非常に価値のあるものである。

予備審査で指摘されたいいくつかの点についてはそれぞれ改良されており、博士論文として価値あるものとなった。